

## ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРНОГО КАСКАДА Wip1-p53 НА ОТВЕТ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ БУТИРАТА НАТРИЯ И ИНГИБИТОРА МЕК/ЕРК-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ

© Е. Ю. Кочеткова,<sup>1,\*</sup> О. Н. Демидов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,  
и <sup>2</sup>INSERM UMR866, Университет Бургундии, Франция;  
\* электронный адрес: lena.linnaea@gmail.com

Использование ингибиторов гистоновых деацетилаз и ингибиторов МЕК/ЕРК-сигнального каскада предлагается как перспективный метод лечения рака. В настоящей работе мы изучили влияние ингибитора гистоновых деацетилаз бутирата натрия и ингибитора МЕК/ЕРК-пути веществом PD0325901 на клетки с делецией генов, участвующих в ответе на противоопухолевую терапию, *Ppm1d* и *Trp53*. Мы исследовали влияние агентов на распределение по фазам клеточного цикла клеток дикого типа, клеток с нокаутом по гену фосфатазы Wip1 и клеток с двойной делецией генов, кодирующих белки Wip1 и p53. Согласно полученным данным, в клетках с отсутствием активной фосфатазы Wip1 (Wip1<sup>-/-</sup>) бутират натрия оказывает более выраженное влияние на фазы клеточного цикла S и G<sub>2</sub>/M, чем в клетках дикого типа, в то время как PD0325901 способствует блоку G<sub>1</sub>-фазе. При этом в ответе на комбинированное действие агентов на клетки Wip1<sup>-/-</sup> доминирует влияние бутирата натрия, в то время как у клеток Wip1<sup>+/-</sup>/p53<sup>+/-</sup> основным является действие PD0325901. Было показано, что клетки Wip1<sup>-/-</sup> и Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>+/-</sup> более чувствительны к ингибитору МЕК/ЕРК-пути, чем клетки дикого типа. Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие фосфатазы Wip1 увеличивает чувствительность клеток к действию бутирата натрия и ингибиторов МЕК/ЕРК-сигнального пути в независимости от присутствия основной мишени Wip1 — фактора p53. Полученные данные позволяют предположить роль фосфатазы Wip1 в ответе клеток на действие ингибитора деацетилаз гистонов и МЕК/ЕРК-сигнального пути.

Ключевые слова: Wip1, p53, клеточный цикл, бутират натрия, МЕК/ЕРК-сигнальный путь.

Принятые сокращения: HDAC — гистоновые деацетилазы (histone deacetylase), NaBut — бутират натрия, PD — PD0325901 (ингибитор сигнального пути МЕК/ЕРК).

В текущее время ведущие направления в борьбе с раковыми заболеваниями связаны с подавлением пролиферации трансформированных клеток и индукцией их гибели. Активно используются ингибиторы сигнальных путей, способствующих поддержанию пролиферации и жизнеспособности клеток, в частности MAP-киназных каскадов.

Отдельный интерес представляют собой ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDAC). Активность ацетилаз и деацетилаз гистонов эпигенетически регулирует активность генов. В нормальных клетках баланс между ацетилированием и деацетилированием N-терминальных концов гистонов важен для регуляции пролиферации и дифференцировки, в то время как нарушение этого баланса может способствовать трансформации (Mahlknecht, Hoelzer, 2000). Исследования показали, что ингибиторы HDAC подавляют пролиферацию раковых клеток, могут индуцировать апоптоз, а также действовать синергетически при использовании в сочетании с различными противоопухолевыми препаратами и ДНК-повреждающими агентами (Munshi et al., 2005; Xu et al., 2008). Одним из свойств ингибиторов HDAC в отношении раковых клеток

является их способность индуцировать ускоренное старение (Зубова и др., 2005; Xu et al., 2005). Клеточное старение — это генетически детерминированная программа, связанная с подавлением пролиферации клеток. В злокачественных клетках программа старения обычно подавлена, однако ускоренное старение можно активировать, используя различные агенты, в число которых входят ингибиторы HDAC (Toussaint et al., 2000). Однако влияние ингибиторов HDAC на нормальные клетки менее изучено.

Одной из перспективных мишеней для исследования в последние годы является серин-треониновая фосфатаза Wip1. Она участвует в регуляции ответа клетки на повреждение ДНК, однако согласно данным из литературы, она обладает свойствами онкогена, и ее роль в развитии злокачественной опухоли неоднозначна (Bulavin et al., 2004; Harrison et al., 2004; Goloudina et al., 2016). Wip1, кодируемая геном *Ppm1d*, является транскрипционной мишенью белка TP53, более известного как p53 (Lu et al., 2008). Белок p53 играет ключевую роль в ответе клетки на повреждение ДНК, а также необходим для регуляции клеточного цикла, инициации апоптоза и клеточного ста-

рения. Фосфатаза Wip1, являясь мишенью p53, в то же время регулирует активность этого белка, дефосфорилируя его непосредственно по Ser15 (Lu et al., 2005). Таким образом, вопрос о ее роли в регуляции устойчивости к трансформации, пролиферации и клеточного старения актуален. Поскольку Wip1 может проявлять свойства онкогена, выяснение ее возможного участия в ответе клеток на ингибиторы сигнальных путей, а также на ингибиторы HDAC также представляет интерес. Было показано, что Wip1-нокаутные эмбриональные фибробласты мыши отвечают ускоренным старением на гипоксию и другие стресс-факторы (Sakai et al., 2014). Изучение ответа нормальных нетрансформированных клеток на препараты, обладающие противоопухолевой активностью, представляется важным для прогнозирования побочных эффектов этих препаратов и отработки более эффективных методов противораковой терапии.

Целью настоящей работы является изучение ответа нормальных эмбриональных фибробластов мыши и фибробластов-нокаутов по гену фосфатазы Wip1 *Ppm1d* на действие ингибитора MEK/ERK-пути вещества PD0325901 (PD) и ингибитора HDAC бутирата натрия (NaBut).

### Материал и методика

**Клеточные линии.** Работа выполнена на эмбриональных фибробластах, полученных из мышей линии C57/Bl6 дикого типа (клетки WT), нокаутов по гену *Ppm1d*, кодирующему фосфатазу Wip1 (клетки Wip1<sup>-/-</sup>), и двойных нокаутов по генам *Ppm1d* и *Trp53* (клетки Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>). Клетки культивировали на среде DMEM, содержащей 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Ингибитором HDAC служил NaBut в концентрации 4 мкМ. В качестве ингибитора MEK/ERK-сигнального пути использовали вещество PD в концентрации 1 мкМ.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла оценивали методом проточной цитометрии. Клетки высевали на чашки Петри и культивировали в присутствии ингибиторов в течение 72 ч. Затем клетки снимали раствором трипсина в версене, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Клетки пермеабелизовывали с помощью 0.0025%-ного сапонина в течение 30 мин при комнатной температуре, промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в присутствии иодистого пропидия и РНКазы А (0.1 мг/мл) в течение 15 мин при 37 °С. Анализ проводили на проточном цитометре Odam (Brucker, Франция).

Изменение жизнеспособности клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Клетки были посеяны на 12-луночные платы. Клетки культивировали с ингибиторами в течение 72 ч. Затем среду заменяли на раствор МТТ в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Через 1 ч раствор МТТ заменяли на DMSO и инкубировали клетки в течение 30 мин. DMSO с растворенным в нем формазаном вносили в лунки 96-луночного планшета по 80 мкл (три повторности на точку) и проводили измерение при длине волны 572 нм.

Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel 2013 с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости  $P < 0.05$ .

### Результаты

Чтобы оценить влияние NaBut и PD на распределение клеток по фазам клеточного цикла, эмбриональные фибробласты мыши культивировали в присутствии ингибиторов в течение 72 ч. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла был осуществлен методом проточной цитометрии. Согласно полученным результатам, NaBut оказывал слабое действие на долю клеток в S-фазе у дикого типа, в то время как у клеток Wip1<sup>-/-</sup> действие NaBut вызывало достоверное падение доли клеток в S-фазе до 7 % по сравнению с 16 в контроле (см. таблицу). NaBut слабо повлиял на доли клеток в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>/M у дикого типа (63 % по сравнению с 62 в контроле для фаз G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; 22.6 % по сравнению с 19.5 для G<sub>2</sub>/M). В то же время в случае клеток Wip1<sup>-/-</sup> NaBut оказал более существенное влияние на фазы G<sub>2</sub>/M, доля клеток в которых выросла на 8 % по сравнению с контролем.

p53 является мишенью Wip1, и большая часть наблюдаемых изменений в Wip1<sup>-/-</sup>-клетках может быть связана с гиперактивацией p53 и нижележащих регуляторных цепей в этих клетках. Поскольку p53 участвует в регуляции прохождения клеток по циклу и может регулировать все фазы и контрольные точки клеточного цикла (North, Hainaut, 2000; Suvorova et al., 2016), мы проанализировали влияние выбранных нами агентов на распределение клеток, полученных из мышей с двойным нокаутом по генам *Ppm1d* и *Trp53*, по фазам клеточного цикла. В нормальных условиях, без стрессорных воздействий доля этих клеток в S-фазе составила 35 %, что значительно выше, чем у клеток WT и Wip1<sup>-/-</sup>, и указывает на более высокую репликативную активность клеток с отсутствующим активным p53.

В данной комбинации удаленных генов NaBut оказал слабое влияние на фазы клеточного цикла S и G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, в то время как доля клеток в фазах G<sub>2</sub>/M выросла с 7.7 % в контроле до 16.7. Таким образом, несмотря на отсутствие активного p53, сохраняется способность NaBut вызывать G<sub>2</sub>/M-блок в клетках с двойной делецией генов (см. таблицу).

В отличие от NaBut подавление MEK/ERK MAP-киназного пути с помощью ингибитора PD способствовало блоку клеток Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> и достоверному снижению доли клеток в S-фазе с 35 до 24 %. В то же время подавление MEK/ERK никак не влияло на прохождение клеток дикого типа по циклу. Доля клеток Wip1<sup>-/-</sup> в S-фазе незначительно снижалась с 16.8 до 12 %, а доля в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> возрастала до 69 % под действием PD (см. таблицу).

Комбинация NaBut и PD оказала наиболее сильное влияние на долю клеток в S-фазе для всех трех линий. Доля клеток WT в S-фазе после совместной обработки NaBut и PD составляет 10.6 %, доля клеток Wip1<sup>-/-</sup> — 6.6 %, клеток Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> — 22.8 % (см. таблицу). Надо отметить, что по сравнению с контролем изменение оказалось наиболее выраженным у Wip1<sup>-/-</sup> — более чем в два раза. Для клеток Wip1<sup>-/-</sup> ответ на сочетанное действие NaBut и PD в большей степени повторяет ответ этих клеток на монотерапию NaBut согласно изменениям доли клеток в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>/M. В то же время в ответе клеток Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> на комбинированное действие агентов доминирует паттерн поведения клеток, похожий на монотерапию PD: доли G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> возрастают до 69 % (по сравнению с 56 % в контроле и 51 % при действии NaBut), доли G<sub>2</sub>/M составляют 8 и 6 % соответственно по сравне-

Распределение по фазам клеточного цикла клеток дикого типа (WT), клеток Wip1<sup>-/-</sup> и клеток Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> в контроле (К) и при раздельном и совместном действии ингибиторов NaBut и PD0325901 (PD) в течение 72 ч

Фаза	К	NaBut	NaBut+PD	PD
Клетки WT				
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	61.9 ± 2.9	62.9 ± 4.4	64.8 ± 4.6 <sup>a</sup>	61.3 ± 3.9
G <sub>2</sub> /M	19.5 ± 4.9	22.7 ± 4.7	24.6 ± 8.6 <sup>a</sup>	21.1 ± 4.8
S	18.2 ± 1.2	14.5 ± 4.6	10.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	17.1 ± 0.8
Клетки Wip1 <sup>-/-</sup>				
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	62.5 ± 4.8	64.5 ± 4.8	61.8 ± 1.6	69.2 ± 6.7 <sup>a</sup>
G <sub>2</sub> /M	20.7 ± 3.2	28.2 ± 3.9 <sup>a</sup>	31.6 ± 4.7 <sup>a</sup>	18.6 ± 4.8
S	16.8 ± 1.6	7.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	6.6 ± 3.1 <sup>a</sup>	12.2 ± 1.9 <sup>a</sup>
Клетки Wip1 <sup>-/-</sup> /p53 <sup>-/-</sup>				
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	56.5 ± 7.8	51.5 ± 14.8	68.9 ± 15.4 <sup>a</sup>	68.9 ± 19.7 <sup>a</sup>
G <sub>2</sub> /M	7.7 ± 2.9	16.7 ± 7.9 <sup>a</sup>	8.7 ± 3.1	6.5 ± 4.2
S	35.2 ± 1.1	31.7 ± 3.8	22.9 ± 6.3 <sup>a</sup>	24.6 ± 11.5 <sup>a</sup>

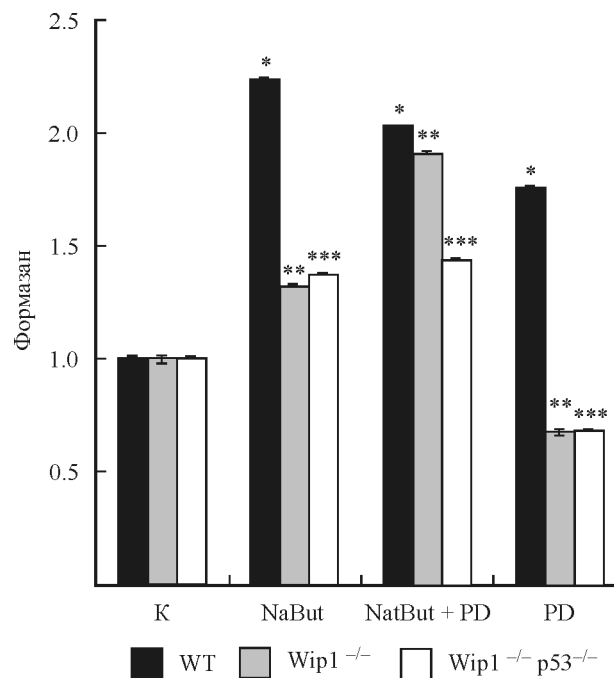
Примечание. Представлены средние значения и их ошибки по результатам трех экспериментов. <sup>a</sup> Различия с контролем достоверны при  $P < 0.05$ .

нию с 7.7 в контроле. Таким образом, при действии ингибиторов в комбинации на клетки Wip1<sup>-/-</sup> в распределении по фазам клеточного цикла доминирует NaBut, при действии на клетки Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> — PD.

Анализ изменения жизнеспособности клеток показал, что клетки Wip1<sup>-/-</sup> образуют формазан с меньшей интенсивностью, чем клетки дикого типа (см. рисунок). При этом интенсивность конверсии МТТ в формазан в NaBut-обработанных клетках не ниже, чем в контроле. В то же время клетки Wip1<sup>-/-</sup> и Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> демонстрируют чувствительность к ингибитору PD (см. рисунок). Через 3 сут культивирования в присутствии PD жизнеспособность этих клеток снижается на 30 % по сравнению с контролем. Таким образом, чувствительность клеток к ингибиторам PD и NaBut является p53-независимой.

## Обсуждение

Комбинации ингибиторов HDAC и ингибиторов различных сигнальных путей в последнее время активно исследуются как возможная стратегия элиминации опухолевых клеток. Однако влияние этих агентов на нормальные клетки менее изучено. Согласно полученным нами данным, эмбриональные фибробласты мыши дикого типа почти нечувствительны к HDAC-ингибитору NaBut и ингибитору MEK-киназы PD, в то время как их комбинация приводит к снижению доли клеток в S-фазе. В то же время отсутствие функционально активной фосфатазы Wip1 способствует подавлению пролиферации одним ингибитором NaBut. Клетки Wip1<sup>-/-</sup> под действием NaBut могут претерпевать старение. Ранее было показано, что нокаутные эмбриональные мышечные фибробласты Wip1<sup>-/-</sup> отвечают ускоренным старением на стрессовые факторы (Sakai et al., 2014). Можно сделать вывод о том, что Wip1 участвует в поддержании устойчивости клеток дикого типа к ингибитору HDAC. Кроме того, Wip1 является не-



Изменение жизнеспособности клеток дикого типа Wip1<sup>-/-</sup> и Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> в контроле (К), при раздельном и совместном (NaBut+PD) действии бутирата натрия (NaBut) и ингибитора PD0325901 (PD) в течение 72 ч культивирования. МТТ-тест.

Количество образованного формазана определяли относительно контроля по поглощению при длине волны 572 нм. Различия между контролем, 72-часовым культивированием в присутствии NaBut (\*), NaBut+PD (\*\*\*) и PD (\*\*\*) считали достоверными при  $P < 0.05$ .

готивным регулятором стресс-киназы p38 (Takekawa et al., 2000). В отсутствие Wip1 активность киназы p38 возрастает, что также может вносить вклад в ответ клеток на действие ингибитора NaBut.

Согласно полученным нами данным, блок G<sub>2</sub>/M при действии NaBut успешно реализуют не только клетки Wip1<sup>-/-</sup>, но и клетки Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>. Белок p53 является одним из ключевых регуляторов клеточного цикла, и потеря его функциональной активности способствует нарушению работы сверхочных точек (чекпойнтов) клеточного цикла. Недавно было показано, что NaBut может способствовать активации сигналинга p53-MDM2 в клетках остеосаркомы (Xia et al., 2016). Активность сигнального пути p53 в клетках Wip1<sup>-/-</sup> в норме и в ответ на действие NaBut требует дальнейшего изучения, однако можно заключить, что наряду с активной p38 активность p53 вносит свой вклад в реакцию клеток на NaBut. Тем не менее накопление клеток Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> в фазе G<sub>2</sub>/M клеточного цикла при действии NaBut может говорить о том, что в данном случае блок может осуществляться через альтернативные пути регуляции. Интересно отметить, что на комбинированное действие ингибиторов NaBut и PD клетки Wip1<sup>-/-</sup> и Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> отвечают по-разному, согласно данным проточной цитометрии: в случае клеток Wip1<sup>-/-</sup> реакция отражает ответ клеток на NaBut, а в случае Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> — ответ на ингибитор PD. Если в случае клеток Wip1<sup>-/-</sup> эффект можно объяснить активностью p53, то в отсутствие p53, по всей видимости, доминирует реакция, связанная с ингибированием сигнального пути MEK/ERK. Было показано, что путь MEK/ERK также может быть вовлечен в регуляцию клеточного цикла (Weber et al., 1997). Это также может объяснять полученный результат, согласно которому совместное действие NaBut и PD оказывает наиболее выраженное действие на клетки всех линий, включая дикий тип.

Мы получили данные о том, что клетки, в которых отсутствует активность Wip1, обладают большей чувствительностью к ингибированию пути MEK/ERK, чем клетки дикого типа. Поскольку, согласно данным МТТ, клетки Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> также чувствительны к действию PD, эта чувствительность, скорее всего, является p53-независимой. Известно, что апоптоз может реализоваться по p53-независимому механизму за счет активности каспазы 8 (Galluzzi et al., 2015). Несмотря на то что в данной работе мы не проводили анализа с использованием ингибиторов рецепторов смерти, мы можем предположить, что в данном случае пути аутофагии и апоптоза пересекаются. Показано, что аутофагия может способствовать сборке комплекса активной каспазы 8 (Young et al., 2012). Механизмы ответа и протекающие при этом процессы в клетках Wip1<sup>-/-</sup> и Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> требуют дальнейшего изучения, однако можно предполагать, что действие ингибитора пути MEK/ERK на клетки с отсутствующей фосфатазой Wip1 вызывает пересечение двух путей клеточной гибели.

Таким образом, согласно полученным нами данным, отсутствие функционально активной Wip1 влияет на распределение эмбриональных фибробластов мыши по фазам клеточного цикла в ответ на действие HDAC-ингибитора NaBut, а также на устойчивость клеток к ингибитору MEK/ERK-пути PD. Полученные данные позволяют сделать предположения о значимости фосфатазы Wip1 в ответе как нормальных клеток, так, возможно, и трансформированных на действие ингибиторов HDAC и сигнального пути MEK/ERK.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00636; О. Н. Демидов, Е. Ю. Кочеткова).

## Список литературы

- Зубова Ю. Г., Быкова Т. В., Зубова С. Г., Абрамова М. В., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2005. Индукция программы ускоренного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в нормальных и трансформированных фибробластах крысы. Цитология 47 (12) : 1055—1062. (Zubova Yu. G., Bykova T. V., Zubova S. G., Abramova M. V., Akse-nov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2005. Induction of premature senescence program by an inhibitor of histone deacetylase sodium butyrate in normal and transformed rat fibroblasts. Tsitologiya. 47 (12) : 1055—1062.)
- Bulavin D. V., Philips C., Nannenga B., Timofeev O., Donehower L. A., Anderson C. W., Appella E., Fornace A. J. Jr. 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. Nat. Genet. 36 : 343—350.
- Galluzzi L., Bravo-San Pedro J. M., Vitale I. et al. 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. Cell Death Differ. 22 (1) : 58—73.
- Goloudina A. R., Kochetkova E. Y., Pospelova T. V., Demidov O. N. 2016. Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. Oncotarget. 7 : 31 563—31 571.
- Harrison M., Degenhardt Y., Hoey T., Powers S. 2004. Wip1-deficient mice are resistant to common cancer genes. Trends Mol. Med. 10 : 359—361.
- Lu X., Nannenga B., Donehower L. A. 2005. Ppm1d dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. Genes Develop. 19 : 1162—1174.
- Lu X., Nguyen T., Moon S., Darlington Y., Sommer M., Donehower L. 2008. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. Cancer Metastasis Rev. 27 : 123—135.
- Mahlknecht U., Hoelzer D. 2000. Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. Mol. Med. 6 : 623—644.
- Munshi A., Kurland J. F., Nishikawa T., Tanaka T., Hobbs M. L., Tucker S. L., Ismail S., Stevens C., Meyn R. E. 2005. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. Clin. Cancer Res. 11 : 4912—4922.
- North S., Hainaut P. 2000. P53 and cell-cycle control: a finger in every pie. Pathol. Biol. (Paris). 48 : 155—270.
- Sakai H., Fujigaku H., Mazur S. J., Appella E. 2014. Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) forestalls cellular premature senescence at physiological oxygen levels by regulating DNA damage response signaling during DNA replication. Cell Cycle. 13 : 1015—1029.
- Suvorova I. I., Grigorash B. B., Chuykin I. A., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2016. G<sub>1</sub> checkpoint is compromised in mouse ESCs due to functional uncoupling of p53-p21/Waf1 signaling. Cell Cycle. 15 : 52—63.
- Takekawa M., Adachi M., Nakahata A., Nakayama I., Itoh F., Tsukuda H., Taya Y., Imai K. 2000. p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. EMBO J. 19 : 6517—6526.
- Toussaint O., Dumont P., Dierick J. F., Pascal T., Fripiat C., Chainiaux F., Sluse F., Eliaers F., Remacle J. 2000. Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress and aging. Ann. N. Y. Acad. Sci. 908 : 85—98.
- Weber J. D., Raben D. M., Phillips P. J., Baldassare J. J. 1997. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G<sub>1</sub> phase. Biochem. J. 326 : 61—68.



Xia C., Wu B., Chen B., Shi Q., Guo J., Fan Z., Huang Y. 2016. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells by regulation of the MDM2-p53 signaling. *Oncotargets Ther.* 4 : 4005—4013. Doi: 10.2147/OTT.S105418.

Xu W. S., Parmigiani R. B., Marks P. A. 2008. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 26 : 5541—5552.

Xu W. S., Perez G., Ngo L., Gui C. Y., Marks P. A. 2005. Induction of polyploidy by histone deacetylase inhibitor: a pathway for antitumor effects. *Cancer Res.* 65 : 7832—7839.

Young M. M., Takahashi Y., Khan O., Park S., Hori T., Yun J., Sharma A. K., Amin S., Hu C. D., Zhang J., Kester M., Wang H. G. 2012. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287 (15) : 12 455—12 468.

Поступила 12 XII 2016

ROLE OF Wip1-p53 AXIS IN RESPONSE OF MURINE CELLS TO TREATMENT WITH SODIUM BUTYRATE AND MEK/ERK SIGNALLING PATHWAY INHIBITOR

E. Yu. Kochetkova,<sup>1</sup> \* O. N. Demidov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,  
and <sup>2</sup> INSERM UMR866, University of Bourgogne, France;  
\* e-mail: lena.linnaea@gmail.com

The use of histone deacetylase inhibitors and inhibitors of MEK/ERK-pathway is proposed as a novel potential approach in cancer treatment. Here we studied the effects of histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, and MEK/ERK-pathway inhibitor, PD0325901, on cells with modifications in genes involved in anti-cancer therapy response, Wip1 phosphatase and p53. We have investigated the effect of these agents on cell cycle of wild-type cells, Wip1 knockout cells and cells with double deletion of Wip1 and p53. Our results showed that more severe changes in S and G<sub>2</sub>/M phases were observed in response to sodium butyrate in Wip1-deficient cells than in wild-type cells. Meanwhile, PD0325901 treatment led to G<sub>1</sub> arrest. At the same time, a «sodium butyrate type» response dominated the response to combined treatment with both drugs in Wip1-deficient cells, while the response of Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> cells to combined treatment was similar to the single use of PD0325901. Wip1<sup>-/-</sup> and Wip1<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> cells were more sensitive to the use of PD0325901 than wild-type cells. Obtained results suggest that Wip1 deficiency sensitizes cells to sodium butyrate and to MEK/ERK inhibitors independently from Wip1 main target protein — p53. Data acquired give insights into role of Wip1 in cellular responses to treatment with HDAC and MEK/ERK inhibitors.

Key words: Wip1, p53, cell cycle, sodium butyrate, MEK/ERK-pathway.